

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”

ТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Методичні вказівки

до виконання лабораторних робіт
для студентів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

*Рекомендовано Вченою радою
факультету біотехнології і біотехніки*

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2017

Технологія продуктів мікробного синтезу: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / Уклад. Л.Б. Орябінська, Л.П. Дзигун, В.Ю. Поліщук. - К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 40 с.

*Гриф надано Вченою радою ФБТ
(Протокол № 13 від 26 червня 2017 р.)*

Навчальне видання

ТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Методичні вказівки

до виконання лабораторних робіт
для студентів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Укладачі: Орябінська Лариса Борисівна, канд. біол. наук, доц.
Дзигун Лариса Петрівна, ст. викладач
Поліщук Валентина Юріївна, асистент

Відповідальний редактор: Т.С. Тодосійчук, д-р. біол. наук, доц.

Рецензент: В.М. Поводзинський, канд. техн. наук, доц.

Зміст

Стор.

Лабораторна робота № 1	
Дослідження маслянокислого бродіння	4
Лабораторна робота №2.	
Характеристика дріжджів як об'єкту біотехнології	8
Лабораторна робота №3.	
Дослідження спиртового бродіння	13
Лабораторна робота №4.	
Дослідження молочнокислого бродіння	20
Лабораторна робота №5.	
Дослідження оцтовокислого бродіння	28
Додаток А	32
Додаток Б	33
Додаток В	38

Вступ

Лабораторний практикум надає студентам можливість оволодіти основними мікробіологічними та біохімічними методами дослідження, які необхідні майбутньому спеціалісту для роботи на виробництвах та в лабораторіях біотехнологічної промисловості.

Студенти вивчають умови отримання та відбору високопродуктивних штамів, які володіють цінними біосинтетичними властивостями, знайомляться з практичним використанням мікроорганізмів у промисловості, отримують в лабораторних умовах ряд біологічно активних речовин – продуктів мікробного синтезу. Студенти навчаються працювати з промисловими штамами мікроорганізмів, підбирати оптимальні середовища для культивування, зберігати штами-продуценти промислово важливих речовин. Засвоюють принципи роботи приладів для культивування мікроорганізмів у лабораторних та виробничих умовах, виділення готового продукту. Засвоюють основні технологічні схеми процесів біосинтезу, навчаються визначати головні параметри культивування мікроорганізмів-продуцентів біологічно активних речовин та контролювати їх. Студенти оволодівають класичними та сучасними методиками вивчення фізіолого-біохімічних властивостей деяких мікроорганізмів.

Лабораторна робота № 1 **Дослідження маслянокислого бродіння** (4 години)

Мета роботи: провести маслянокисле бродіння та за якісними реакціями встановити наявність у бражці масляної кислоти. Ознайомитись з морфологічними та біохімічними ознаками збудників маслянокислого бродіння.

Короткі теоретичні відомості

Клостридії – грампозитивні (старіюча культура може забарвлюватися як грамнегативна), рухливі, паличкоподібні форми, які можуть досягати розміру $1-2 \times 10$ мкм. Рух клостридій здійснюється за допомогою перитрихіально розташованих джгутиків. У міру старіння в процесі циклу розвитку клітини втрачають рухливість, накопичують гранульозу (запасна речовина типу крохмалю) і переходять до спороутворення. Утворені спори мають овальну або сферичну форму. Діаметр їх, як правило, перевищує діаметр вегетативної клітини. При утворенні спор клітини набувають веретеноподібну форму (клостридіальний тип спороутворення), іноді форму барабанної палички (плектридіальні форми). Спори термореzистентні. Вони гинуть при автоклавуванні протягом 24 хвилин при температурі 120°C при тиску 1 атм. У висушеному стані спори гинуть при нагріванні до $150-160^{\circ}\text{C}$ протягом

декількох годин. Вегетативні клітини втрачають життєздатність при 80°C за 10 хвилин.

Клостридії облигатні анаероби. Однак спектр чутливості клостридій до молекулярного кисню достатньо широкий, що пов'язано з функціонуванням ферменту супероксиддисмутази або іншими механізмами, що допомагають клітинам нейтралізувати токсичні ефекти O_2 і його похідних. Джерело енергії клостридій в більшості випадків – маслянокисле бродіння.

Більшість бактерій роду клостридій сапрофіти, що мешкають у ґрунті. Деякі види клостридій живуть в кишечнику людини і тварин. До цього роду належать вельми небезпечні патогенні форми: *Clostridium tetani* – збудник правця, *C. perfringens* – збудник газової гангрені, *C. botulinum* – збудник ботулізму.

В біотехнологічних виробництвах в якості продуцентів масляної кислоти використовують штами *C. butyricum*, а в якості продуцентів нейтральних продуктів *C. acetobutylicum*.

Джерелом вуглецю для маслянокислих бактерій можуть служити моно- і дисахариди, деякі полісахариди (декстрин, крохмаль), лактат і піруват, маніт, гліцерин та ін. Можливість розвиватися на крохмалистих середовищах без попереднього їх гідролізу пов'язано зі здатністю маслянокислих бактерій утворювати фермент амілазу. У складних білкових середовищах при відсутності вуглеводу, що зброджується, маслянокислі бактерії ростуть погано або не ростуть зовсім. Джерелом азоту для них виступають різноманітні речовини: амінокислоти, аміачні сполуки і навіть молекулярний азот.

Маслянокисле бродіння починається з трансформації цукрів у піруват шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса. Кінцеві продукти з пірувату утворюються в ланцюзі послідовних реакцій, каталізуємих кількома ферментними системами. Нове у маслянокислому бродінні – виникнення реакцій конденсації типу $C_2 + C_2 = C_4$, в результаті чого утворюється C_4 -акцепторна кислота - ацетоацетил Ко-А, що відновлюється НАДН(H^+). Кінцевим C_4 -продуктом бродіння є масляна кислота.

Схема перетворення пірувату, що утворюється в процесі гліколізу, представлена на рис.1.

Піруват перетворюється на ацетил-КоА, CO_2 і H_2 за участі ферментної системи: піруват:ферредоксин-оксидоредуктази. З ацетил-КоА через ацетилфосфат синтезується ацетат. Синтез бутирату починається з конденсації двох молекул ацетил-КоА, що виникли в результаті декарбоксилювання пірувату. Це призводить до утворення ацетоацетил-КоА. Останній відновлюється у β -оксибутирил-КоА. З відщеплення від молекули β -оксибутирил-КоА молекули води виникає кротоніл-КоА, який ферментативно відновлюється в бутирил-КоА. Після гідролізу бутирил-КоА і перенесення КоА на ацетат у цьому відновлювальному шляху утворюється масляна кислота.

Процес розкладу пірувату може здійснюватися і по окисному шляху. Перетворення ацетил-КоА в ацетилфосфат, а потім в ацетат супроводжується синтезом АТФ. Таким чином, в процесі субстратного фосфорилування при

маслянокислому бродінні синтезується третя молекула АТФ (дві інші утворилися в процесі гліколітичного розщеплення глюкози). Напрямок біохімічного розпаду пірувату залежить від ряду причин: віку культури, умов культивування, складу середовища, тощо.

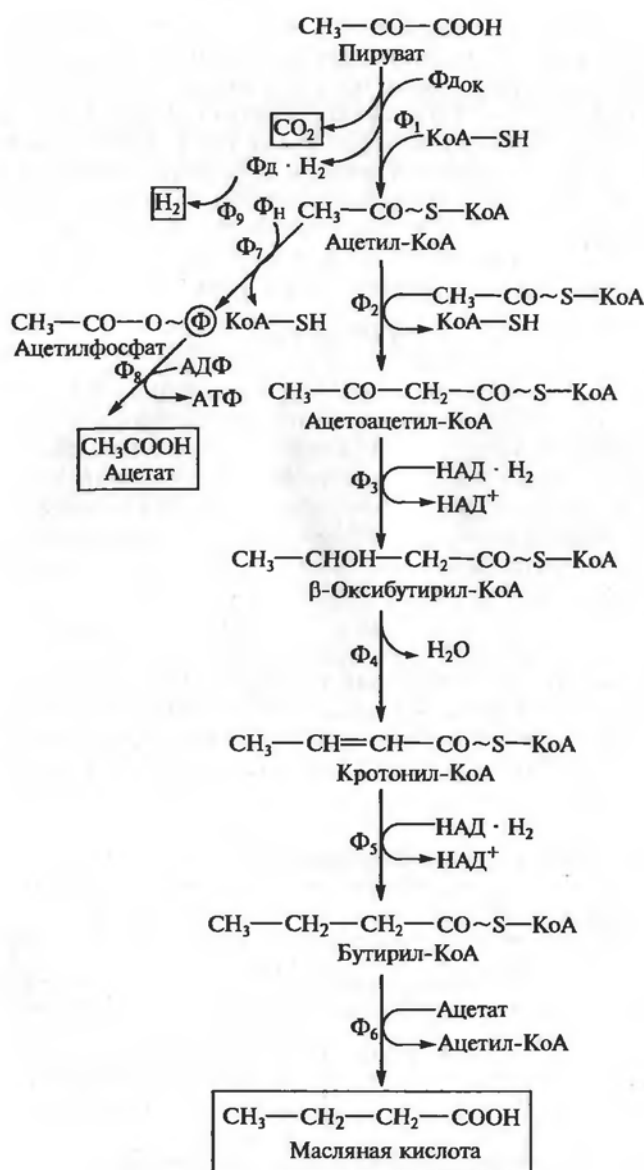


Рис. 1. Шляхи перетворення пірувату в маслянокислому бродінні, що здійснюється *Clostridium butyricum*:

Φ₁ – піруват:ferredоксин-оксидоредуктаза; Φ₂ – ацетил-КоА-трансфераза (тіолаза); Φ₃ – β-оксибутирил-КоА-дегідрогеназа; Φ₄ – кротоназа; Φ₅ – бутирил-КоА-дегідрогеназа; Φ₆ – КоА-трансфераза; Φ₇ – фосфотрансацилаза; Φ₈ – ацетаткиназа; Φ₉ – гідрогеназа; ФД_{ок} – окислений, ФД · Н₂ – відновлений ферредоксин; Ф_н – неорганічний фосфат

Сумарне рівняння маслянокислового бродіння:



Маслянокисле бродіння – не завжди бажаний процес. Наприклад, при його розвитку у кормах, що заквашуються, білкова частина корму

розкладається, а накопичена масляна кислота надає продукту неприємний запах. Разом з тим для деяких промислових цілей потрібна чиста масляна кислота. Її отримують на заводах, спеціально зброджуючи підготовлені середовища чистою культурою маслянокислих бактерій. Утворену кислоту відокремлюють і очищують хімічним методом.

Завдання до лабораторної роботи:

1. Одержати накопичувальну культуру маслянокислих бактерій і ознайомитися з їхніми морфологічними особливостями.
2. Провести спостереження за процесом бродіння.
3. Поставити якісні реакції на масляну кислоту.
4. Простежити за зміною форми клітин і спороутворенням, а також накопиченням гранульози в бактерій.
5. Занотувати в протокол морфологічні та біохімічні особливості збудників маслянокислого бродіння. Занести в протокол схему маслянокислого бродіння. Практичне значення маслянокислого бродіння та його збудників.

Хід роботи

Заняття 1. Селективне виділення маслянокислих бактерій з природних джерел існування

Збудники маслянокислого бродіння – анаеробні маслянокислі бактерії – широко розповсюджені в природі. Відмінною морфологічною особливістю їх є здатність до спороутворення і синтезу гранульози. Крім того маслянокислі бактерії утворюють фермент амілазу, що забезпечує їм можливість розвиватися на крохмалистих середовищах без попереднього їх гідролізу.

Для проведення дослідження **сиру і неочищену** картоплю нарізають дрібними шматочками, заповнюють нею 1/3 об'єму широкої і високої пробірки, заливають водопровідною водою до 2/3 загального об'єму пробірки. Зважують на вагах та додають до пробірки 0,5 г крейди. Пробірку ставлять у киплячу водяну баню на 2 хвилини, після чого охолоджують під проточною водою. Охолоджену пробірку поміщають у термостат з температурою 35-37°C. Протягом 1-2 діб у пробірці буде йти маслянокисле бродіння.

Заняття 2. Дослідження морфології та біохімічної активності маслянокислих бактерій

Про факт проходження маслянокислого бродіння свідчить неприємний запах масляної кислоти з дослідної пробірки. У процесі бродіння утворюються гази (водень, CO₂), що піднімають картопляний затор вгору.

Морфологія маслянокислих бактерій.

Готують препарат живих клітин на предметному склі зі збродженої рідини, взятої з дна пробірки. У препарат додають 1-2 краплі розчину Люголя, накривають покривним склом, досліджують мікроскопічну картину у імерсійній системі. Ті місця клітини, де міститься гранульоза, забарвлюються у

синій колір. При спороутворенні форма клітин змінюється; утворюються кlostридіальні, а іноді плектридіальні форми.

Мікроскопічну картину замальовують у протоколі.

Якісні реакції на масляну кислоту:

1) в пробірку до 5 мл відцентрифугованої культуральної рідини додають 0,5 мл 96%-вого етилового спирту і 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Суміш нагрівають у полум'ї пальника, обережно збовтуючи, при цьому виділяється характерний запах масляно-етилового ефіру – запах ананаса;

2) до 5 мл збродженого субстрату додають 2 мл 5%-вого розчину хлорного заліза. Суміш нагрівають у полум'ї пальника. При нагріванні утворюється коричневе забарвлення внаслідок утворення маслянокислого заліза;

3) масляна кислота легко розпізнається за характерним для неї запахом прогірклої олії.

Результати проведених дослідів заносять у протокол та роблять висновок стосовно проходження маслянокислого бродіння.

Контрольні питання та завдання:

1. Назвіть типових представників маслянокислих бактерій та наведіть їх морфологічні та біохімічні ознаки.
2. Якої форми набувають клітини при утворенні спор та чому? Як ці форми називаються?
3. З якого біохімічного процесу починається маслянокисле бродіння?
4. Які нові реакції зустрічаються у маслянокислому бродінні у порівнянні з іншими видами бродіння?
5. Що дає можливість маслянокислим бактеріям використовувати в якості сировини негідролізований крохмаль?
6. Що у проведеному досліді виступає джерелом маслянокислих бактерій?
7. З якою метою у проведеному досліді до поживного середовища додають крейду?
8. З якою метою дослідну пробірку попередньо поміщають до киплячої водяної бані? Як цей процес називається?

Лабораторна робота №2

Характеристика дріжджів як об'єкту біотехнології

(4 години)

Мета роботи: ознайомитися з морфологічними особливостями дріжджів, отриманих з різних джерел, дослідити наявність включень та процес спороутворення, одержати гігантські колонії та поставити бродильні проби.

Короткі теоретичні відомості

Терміном «дріжджі» позначають одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми, які в залежності від наявності та типу полового процесу відносять до відділів грибів: *Ascomycota* та *Basidiomycota*. Термін «дріжджі» не має таксономічного

значення. *Saccharomyces cerevisiae*, які найбільш часто застосовуються, відносяться до аскоміцетів (клас *Hemiascomycetes*; порядок *Saccharomycetales*; родина *Saccharomycetaceae*; рід *Saccharomyces*; вид *S. cerevisiae*).

Форма дріжджових клітин різноманітна: кулеподібна, овальна, циліндрична, витягнута, еліпсоподібна, трикутна.

Дріжджі – органотрофи, здебільшого аероби чи факультативні анаероби. Вони мають сформований апарат дихання. При доступі кисню клітини дріжджів здійснюють аеробне дихання, тобто піровиноградна кислота, що утворилася з вуглеводів при гліколітичному їх розкладі, окислюється у циклі трикарбонових кислот з утворенням CO_2 та H_2O . В анаеробних умовах дріжджі отримують енергію від зброджування вуглеводів за рахунок субстратного фосфорилування в процесі спиртового бродіння. Явище пригнічення спиртового бродіння в аеробних умовах носить назву «ефекту Пастера».

Аеробне дихання дає значно більше енергії, ніж бродіння, тому для отримання такої ж кількості молекул АТФ при такому диханні необхідно менше вуглеводів. Отже, коефіцієнт використання вуглеводів збільшується. Для отримання більшої маси дріжджів, наприклад при виробництві пекарських дріжджів, живильне середовище, в якому відбувається їх розмноження, аерують. Навпаки, при виробництві спирту процес ведеться в анаеробних умовах, щоб повністю виключити потрапляння O_2 , який гальмує утворення етилового спирту.

Зброджування вуглеводів дріжджами з утворенням етанолу і CO_2 йде гліколітичним шляхом (Ембдена-Мейєргофа-Парнаса). Піруват, що утворився в результаті, під впливом піруватдекарбоксилази перетворюється на ацетальдегід, який потім відновлюється НАД $\cdot\text{H}_2$ -алкогольдегідрогеназою до етанолу.

У природі дріжджі знаходяться в ґрунті, на поверхні рослин, плодів, ягід. Розмножуються дріжджі статевим і нестатевим шляхом. Способи нестатевого розмноження наведені на рис. 2.

Статева стадія у дріжджів може бути представлена асками або базидіями. Спори у дріжджів утворюються тільки при нестачі поживних речовин у присутності достатньої кількості кисню. Кількість спор в клітині різних видів дріжджів різна. Їх може бути дві, чотири, а іноді вісім і навіть дванадцять.

Клітини дріжджів можуть містити у великій кількості запасні речовини:

- **Волютин** (метахроматин) накопичується в вакуолях у вигляді колоїдного розчину або гранул. Гранули можуть бути локалізовані безпосередньо в цитоплазмі. Волютин – джерело фосфору і акумулятор енергії.

- **Жирові включення.** У молодих дріжджових клітинах жиру зазвичай немає, в зрілих він міститься лише в небагатьох клітинах у вигляді дрібних крапель, а в старих – у вигляді великих.

- **Глікоген** - накопичується при культивування дріжджів на середовищах, багатих цукром. При нестачі харчування глікоген швидко витрачається. У молодих клітинах глікогену мало, в зрілих – до 40%.

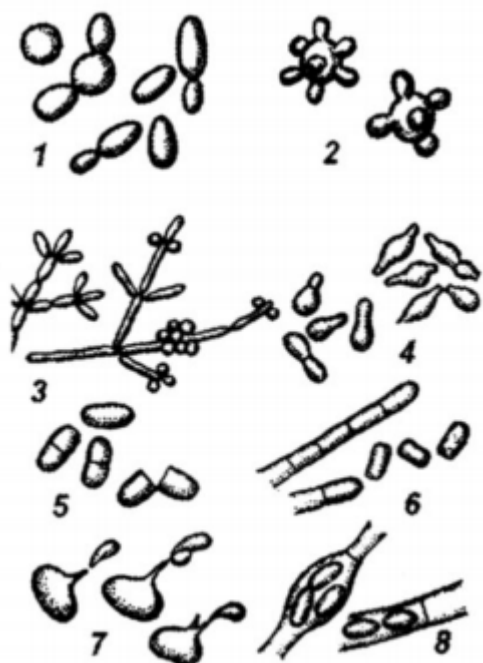


Рис. 2. Способи нестатевого розмноження дріжджів: 1 – брунькування; 2 – множинне брунькування; 3 – утворення псевдоміцелію з бластоспорами у представників роду *Candida*; 4 – брунькування з подальшим поділом у представників роду *Nadsonia*; 5 – поділ; 6 – поділ і утворення псевдоміцелію у представників роду *Schizosaccharomyces*; 7 – утворення балістоспор у представників роду *Sporobolomyces*; 8 – ендоспори.

Найбільше практичне значення має вид дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, які відносяться до аскоміцетів. До цього роду відносять раси, що використовуються в харчовій промисловості: хлібопеченні, виробництві спирту, пивоварінні, виноробстві, виробництві квасу. Корисні фізіологічні властивості дріжджів *S. cerevisiae* дозволяють використовувати їх і у виробництві ферментів, ліпідів, вітамінів, харчових домішок, пробіотиків та харчового білку.

На діяльності дріжджів роду *Candida*, таких як *C. utilis*, *C. scottii* та *C. tropicalis* засноване отримання кормового білку та БВК. При культивуванні цих дріжджів на середовищах з дешевим джерелом вуглецевого живлення (м'яса, відходи целюлозної або текстильної промисловості, метанол, етанол тощо) вдається отримувати значну біомасу, яка містить повноцінний білок. Дріжджі сепарують і використовують для кормових цілей. Розроблено й спосіб вирощування кормових дріжджів на відходах нафтової промисловості.

Типовими ліпідоутворювачами є дріжджі *Cryptococcus terricolus*. Вони можуть синтезувати велику кількість ліпідів (до 60% від сухої маси) в будь-яких умовах, навіть найбільш сприятливих для синтезу білка. З інших ліпідоутворюючих дріжджів промисловий інтерес представляють дріжджі *C. guilliermondii*, що утилізують алкани. *C. guilliermondii* синтезують в основному фосфоліпіди. Подібні організми, які отримали технічну назву «жирові», запропоновано застосовувати для мікробіологічного отримання цінних технічних жирів.

Існують форми дріжджів, що накопичують значні кількості вітамінів, на основі даної властивості побудовані виробництва вітамінів для медицини і сільського господарства.

Не всі дріжджі приносять користь людині. Серед дріжджів є шкідники харчових продуктів та збудники мікозів.

Завдання до лабораторної роботи:

1. Дослідити морфологію дріжджів.
2. Виявити у клітинах різноманітні включення – волютин, жир, глікоген.
3. Дослідити спороутворення у дріжджів.
4. Поставити бродильні проби.
5. Одержати гігантські колонії.
6. Занотувати в протокол відомості про особливості морфології та метаболізму дріжджів. Практичне значення дріжджів.

Хід роботи

Заняття 1. Вивчення морфології дріжджів. Одержання включень.

Морфологія дріжджів.

Для ознайомлення з морфологією дріжджів готують ряд мазків із різноманітних субстратів – пресованих дріжджів, осаду вина і пива, кефіру, розсолу, а також 5-6 мазків із чистих музейних культур дріжджів різних видів. Препарати фіксують, фарбують простим методом за допомогою фуксину і вивчають морфологію дріжджової клітини. Замальовують розташування і форму клітин.

Одержання включень.

Для одержання різноманітних включень культуру дріжджів *S. cerevisiae* висівають на наведені нижче середовища та вирощують при температурі 28°C. З вирослих культур готують необхідні препарати для мікроскопічного дослідження та розглядають їх в імерсійній системі.

Волютин. Культуру дріжджів вирощують на середовищі, збагаченому фосфатами (6°Б сусло-агар + 3 г/л K_2HPO_4).

Жир. Для одержання включень жиру культуру дріжджів вирощують на середовищі, багатому вуглеводами. Для цього використовують 12°Б сусло-агар або м'ясо-пептонний агар із 2% глюкози.

Глікоген. Для збагачення дріжджів глікогеном їх спочатку вирощують на рідкому 6°Б суслі, а через добу зливають культуральну рідину з осаду дріжджів і додають до них 20%-вий розчин сахарози. Ще через добу клітини дріжджів переповнюються глікогеном.

Спороутворення у дріжджів. Для дослідження спороутворення у культурі дріжджів необхідно створити певні умови. Спори утворюють молоді дріжджові клітини, які вирощувалися на багатих середовищах в аеробних умовах за значної вологості з подальшим переведенням культури на середовища з нестачею джерел живлення.

Для визначення здатності дріжджів до спороутворення роблять посів 2–3-добової культури дріжджів на сусло-агар і витримують при 28°C протягом доби. З цієї одностовової культури роблять посів на поверхню бідного вуглеводами поживного середовища. З цією метою можливо використовувати середовище Городкової, гіпсові блоки, а також метод Бейєринка.

Середовище Городкової (у г/л): пептон – 10; глюкоза – 12,5; м'ясний екстракт – 10; агар-агар – 10; NaCl – 5; дист. вода – 1000. Стерилізують

середовище при 0,5 атм. 20 хвилин.

Гіпсові блоки готують у такий спосіб: 2 частини порошку гіпсу замочують у 3 частинах води до консистенції густої сметани і виливають цю масу в паперові формочки, розташовані на рівному склі. Через якийсь час паперову форму видаляють, твердий гіпсовий блок поміщають у чашку Петрі гладкою поверхнею до гори, наливають до половини блоку воду. На гладкій поверхні петлею розмазують краплю культури дріжджів і витримують у термостаті 2-3 доби.

Метод Бейєринка. Молоду культуру дріжджів, що добре харчувалися, висівають на середовище наступного складу (г/л): вилужений агар-агар – 40; дистильована вода – 1000. Стерилізують середовище при 1 атм. 20 хвилин.

Культури дріжджів із метою виявлення спороутворення засівають одним з трьох або всіма трьома описаними вище методами. Посіви вирощують у термостаті протягом 2-3 діб.

Бродильна проба. Готують ряд пробірок з напіврідкими стандартними середовищами, що містять різноманітні джерела вуглецю – глюкозу, сахарозу, мальтозу, левульозу та ін. (можна використовувати рідке середовище із канюлями). Стерильні середовища засівають дріжджами уколом і поміщають у термостат при температурі 28°C на 7 діб.

Гігантські колонії дріжджів. Для одержання гігантських колоній, морфологія, яких є таксономічною ознакою, на скошений 6°Б сусло-агар, розлитий у чашки Петрі, наносять петлею культури дріжджів. Посіви витримують при 28°C протягом 7 діб.

Заняття 2. Визначення включень, спор, гігантських колоній дріжджів.

Волютин. Препарати для дослідження включень волютину готують із старої культури дріжджів двома наведеними нижче методами.

1) Препарат, зафіксований у полум'ї пальника, забарвлюють метиленовою синню, приготованою за Леффлером, витримують 2 хвилини. Барвник змивають, препарат переглядають у імерсійній системі. Волютинові зерна забарвлені у фіолетовий колір, протоплазма – у блакитний.

2) Метод Омелянського. Препарат, зафіксований у полум'ї пальника, забарвлюють протягом 30 секунд карболовим фуксином Циля. Промитий водою препарат знебарвлюють 1%-вим розчином сірчаної кислоти протягом 20-30 секунд, знову промивають водою і додатково фарбують слабким розчином метиленової сині (1:40) протягом 15-20 хвилин. Барвник змивають, препарат переглядають у імерсійній системі. Зерна волютину мають червоний колір, протоплазма – синій.

Жир. Препарати для дослідження включень жиру готують із культури дріжджів двома наведеними нижче методами.

1) На предметному скельці готують суспензію дріжджів у краплі фізіологічного розчину і Судану III, накривають покривним скельцем та переглядають у імерсійній системі. Цитоплазма клітини залишається незабарвленою, а краплі жиру забарвлюються в помаранчево-червоний колір.

2) Метод Мейєра. Краплю суспензії дріжджів змішують на предметному склі з краплею 40%-вого формаліну і залишають на 5 хвилин. Фіксований в такий спосіб препарат забарвлюють розчином метиленової сині (1:40) протягом 10 хвилин, потім туди ж додають краплю розчину Судану III. Препарат переглядають у імерсійній системі. Цитоплазма клітини забарвлюється в синій колір, а краплі жиру – у рожевий або жовтогарячий.

Глікоген. Препарат для дослідження включень глікогену готують із культури дріжджів наведеним нижче методом.

Препарат дріжджів на предметному скельці фіксують сумішшю спирт:ефір, змішаних у співвідношенні 1:2. Потім препарат фарбують розчином йоду в йодистому калії. Барвник змивають, препарат переглядають у імерсійній системі. При взаємодії з розчином йоду глікоген набуває червоно-бурого забарвлення.

Спороутворення у дріжджів. Препарати для дослідження спороутворення дріжджів готують наведеним нижче методом.

Забарвлення спор у дріжджів. Препарат, зафіксований у полум'ї пальника, фарбують карболовим фуксином протягом 5-10 хвилин при нагріванні над полум'ям пальника. Вся клітина і її включення забарвлюються в червоний колір. Препарат занурюють на 0,5-1 хвилину в кислий спирт, у якому всі частини клітини, крім спор, знебарвлюються. Для диференціації спор препарат забарвлюють при нагріванні над полум'ям пальника розведеним розчином метиленової сині (1:40). При цьому клітина забарвлюється у світло-блакитний колір, спори залишаються червоними.

Бродильна проба. Посіви переглядають і реєструють газоутворення (за появою бульбашок газу в товщі напіврідкого середовища або заповненням канюлі CO₂) і кислотоутворення (за зміною забарвлення середовища).

Гігантські колонії дріжджів. Описують і замальовують зовнішній вигляд гігантських колоній і їх будову (спостереження ведуть у бінокулярний мікроскоп).

Результати проведених дослідів заносять у протокол, усі мікроскопічні картини замальовують.

Контрольні питання та завдання:

1. Охарактеризуйте таксономічне положення дріжджів.
2. Наведіть систематику *Saccharomyces cerevisiae*.
3. У чому особливості метаболізму дріжджів?
4. Яким шляхом дріжджі зброджують вуглеводи?
5. Як розмножуються дріжджі?
6. Які запасні речовини можуть накопичуватися в клітинах дріжджів? Які умови необхідно створити для їх дослідження?
7. Практичне значення дріжджів?
8. За яким умов відбувається спороутворення у дріжджів?
9. Методи виявлення різноманітних включень.
10. З якою метою досліджують гігантські колонії дріжджів?
11. У чому особливості забарвлення спор у дріжджів?

Лабораторна робота №3. Дослідження спиртового бродіння (10 годин)

Мета роботи: приготувати та визначити основні показники середовища для спиртового бродіння, провести дослідне бродіння, визначити показники, що його характеризують.

Короткі теоретичні відомості

Основними збудниками спиртового бродіння служать дріжджі. Традиційно їх застосовують в хлібопеченні, для отримання спирту та цілого ряду інших продуктів. У бродильних виробництвах використовують представників родів *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus* – у виробництві спирту та пива, *S. cerevisiae*, *S. oviformis*, *S. ellipsoides* – у виробництві вина) і *Schizosaccharomyces* (*S. pompe* і *S. ostosporus*).

У невеликих кількостях спирт може накопичуватися в середовищі, що містить вуглеводи, при розвитку на ньому окремих видів грибів родів *Aspergillus* (*A. oryzae* застосовується на сході для виробництва рисового пива «саке»), *Mucor* і *Fusarium* і бактерій (*Zymomonas mobilis* застосовується у Мексиці для отримання національного спиртового напою «пульке», *Z. anaerobica*, *Sarcina ventriculi*, *Erwinia amylovora* та ін.)

Zymomonas mobilis – мезофільні бактерії, які відрізняються від дріжджів дуже інтенсивним метаболізмом. Це грамнегативні палички, серед яких зустрічаються рухомі та нерухомі форми. Ендоспор не утворюють, аеротолерантні, оптимальна температура 30-35°C, ростуть при рН 3,5-7,5. *Z. mobilis* один з небагатьох анаеробів, що розкладає глюкозу шляхом Ентнера-Дудорова, який зазвичай функціонує у строго аеробних організмів.

Штами *Saccharomyces cerevisiae* підрозділяють на раси *верхового* та *низового* бродіння. Перші використовують для бродіння при температурі 14-25°C. У таких умовах рясно виділяється диоксид вуглецю, спостерігається піноутворення. Клітини мікроорганізмів підіймаються на поверхню рідини, що бродить. Верхові раси використовують в спиртовій промисловості, хлібопеченні. Дріжджі низового бродіння застосовують у виробництві при температурі 6-10°C і нижче (до 0°C). При цьому бродіння відбувається спокійно і маса дріжджових клітин залишається на дні реактору. Низові раси зазвичай використовують у пивоварінні та виноробстві, де застосовують раси *S. cerevisiae*, адаптовані до життєдіяльності при зниженій температурі.

По поведінці у бродильному середовищі дріжджі поділяють на *пластівцеподібні* та *пилеподібні*. В основі такого поділу лежить різниця у їх флокуляційних властивостях (флокуляція – оборотна агрегація, або аглютинація, клітин).

Зброджування вуглеводів дріжджами з утворенням етанолу і CO₂ йде *гліколітичним шляхом* (Ембдена-Мейергофа-Парнаса). Піруват, що утворюється в результаті, під впливом піруватдекарбоксилази перетворюється

на ацетальдегід, який потім відновлюється НАД•Н₂-алкогольдегідрогеназою до етанолу; при цьому використовується водень, що мобілізуються при окисленні гліцеральдегід-3-фосфату.



Зазвичай спиртове бродіння протікає при кислій реакції середовища (рН 4-5). Якщо реакцію поживного середовища підтримувати на лужному рівні (близько рН 8), то одним з основних продуктів бродіння буде гліцерин. Різко підвищується вихід гліцерину і якщо бродіння протікає у присутності бісульфіту натрію. У такому випадку ацетальдегід зв'язується бісульфітом натрію і не може бути відновлений воднем в етиловий спирт.

На початку спиртового бродіння дигідроксиацетонфосфат, що є проміжною сполукою утворення гліцерин-3-фосфату також виконує роль акцептора водню, поки не накопичиться ацетальдегід, необхідний для окислення НАД•Н₂. Цим пояснюється особливий період індукції на початку бродіння, під час якого з'являється гліцерин. Одночасно гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється згідно реакцій гліколітичного шляху в піруват, а після декарбоксилування – в ацетальдегід (рис. 3).

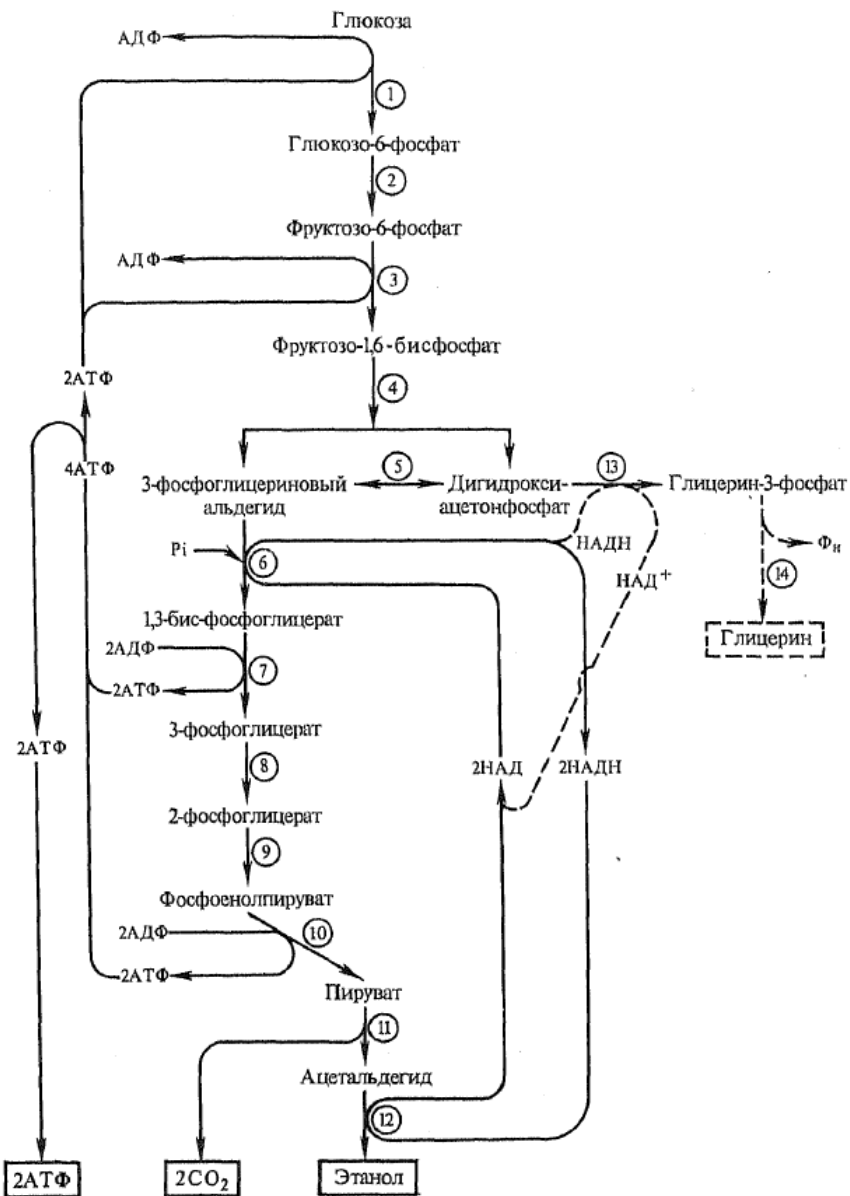
Однак ацетальдегід не може відновлюватися в етанол, оскільки НАД•Н₂ вже використаний для утворення гліцерину з дигідроксиацетонфосфату. Тому при утворенні в процесі бродіння однієї молекули гліцерину накопичується одна молекула пірувату або ацетальдегіду, яка в етанол не перетворюється.

Отже, на початку спиртового бродіння переважає гліцеринпіруватне бродіння, що приводить до утворення гліцерину і пірувату. Останній виявляється в невеликих кількостях, оскільки основна його частина йде на утворення *вторинних продуктів* – оцтової, молочної, янтарної, пропіонової та інших органічних кислот, а також діацетилу, ацетоїну, різних альдегідів і складних ефірів.

Крім вторинних продуктів, при спиртовому бродінні утворюються *побічні продукти* – вищі спирти, або так звані сивушні масла. До цих сполук відносяться аміловий, ізоаміловий, бутиловий, пропіловий і ароматичні спирти (β-фенілетиловий, п-оксифенілетиловий). Перераховані речовини утворюються з відповідних кетокислот, синтезованих у процесі метаболізму вуглеводів, або з амінокислот.

Промисловість випускає харчовий та технічний спирт. Харчовий спирт отримують з сировини, що містить крохмаль (зерна та картоплі), та сировини, що містить цукор (меляси, цукру-сирцю, цукрового буряка). Сировина, що містить крохмаль, піддається тривалій багатоступеневій обробці для переводу крохмалю у вуглеводи, що зброджуються – моно- та дисахариди. Харчовий спирт застосовують для приготування лікєро-горілчаних виробів, виноградних та плодових вин, а також у виробництві парфумерних виробів та ряду медичних препаратів.

Технічний спирт отримують з газів, що містять етилен (синтетичний



3. Провести дослідне бродіння та визначити наступні показники культуральної рідини:

- а) відсоток життєздатних клітин;
- б) рН;
- в) залишковий вміст редукуючи цукрі;
- г) відсоток етанолу.

4. Зробити теоретичний розрахунок виходу спирту за збродженим цукром і CO_2 , що виділився. Порівняти дані теоретичного розрахунку з отриманими експериментальними.

5. Занести в протокол відомості про мікроорганізми, які здатні викликати спиртове бродіння, їх особливості та сировину, що може бути використана для отримання спирту. Навести схему спиртового бродіння. Значення спиртового бродіння для промисловості.

Хід роботи

Заняття 1. Приготування та аналіз середовища культивування дріжджів та посівного матеріалу

1. Приготування та аналіз середовища культивування.

В якості середовища для проведення спиртового бродіння використовують вуглеводмістну сировину, таку як неохмелене пивне сусло, меляса, глюкозо-фруктозний сироп, тощо. Її розливають у півлітрові стерильні колби Ерленмейера по 200 мл у кожную. Стерилізують під тиском 0,5 атм. протягом 20 хвилин. Перед засівом із колби стерильно відбирають 50 мл середовища, в якому визначають рН і вміст цукрів.

а) Визначення рН живильного середовища здійснюють потенціометрично за допомогою рН-метру.

б) Визначення концентрації редукуючих цукрів за **методом Бертрана**:

Для визначення концентрації *редуючих цукрів* в суслі необхідно провести спочатку гідроліз *нередукуючих цукрів до редукуючих*. Для гідролізу сахарози або інших нередукуючих цукрів до 20 мл досліджуваної рідини додають 2 мл 5% розчину HCl та ставлять на киплячу водяну баню на 30 хв. Для аналізу відбирають 0,1-2 мл отриманої рідини.

Для визначення концентрації редукуючих цукрів, які отримані в результаті гідролізу, у конічну колбу на 200-300 мл вносять 0,1-2 мл досліджуваної рідини та дистильованої води, так щоб загальний об'єм дорівнював 20 мл, 20 мл реактиву Фелінга I і 20 мл реактиву Фелінга II.

Колбу нагрівають до кипіння на нагрівальному елементі електричної плитки. Кип'ятять точно 3 хвилини, рахуючи з моменту появи бульбашок.

Червоний осад оксиду міді (I), що випав, переносять кількісно у центрифужну пробірку та центрифугують при 5000 об./хв. протягом 3 хвилин. Фугат обережно зливають, осад у пробірці промивають 20 мл гарячої дистильованої води, центрифугуючи за тих же умов.

Промитий осад кількісно переносять у конічну термостійку колбу на 250 мл незначною кількістю води, додають 15-20 мл кислого розчину сульфату

заліза (III) та розчиняють, нагріваючи на водяній бані.

Отриманий розчин титрують перманганатом калію до появи слабо-рожевого забарвлення, стійкого протягом 1 хв.

Паралельно з основним аналізом проводять контрольне титрування для визначення поправки на реактиви. Визначення ведуть так само, але замість досліджуваного розчину для аналізу беруть 2 мл дистильованої води. Поправку виражають у мл розчину перманганату калію, і для розрахунку віднімають з кількості перманганату калію, що пішла на титрування досліджу.

Концентрацію цукрів розраховують за формулою:

$$\% \text{ глюкози} = \frac{A \times 100}{B \times 1000} = \frac{A}{10B}, \text{ де}$$

В – кількість досліджуваної рідини (мл), взята для визначення;

А – визначена за таблицею (див. додаток А) кількість глюкози (мг), що відповідає кількості відновленої міді М(Сu) (мг).

$M(Cu) = (a-b) \cdot K$, де (а-в) – різниця (мл) розчину перманганату калію, що витрачено на титрування дослідної та контрольної проб; К – титр розчину перманганату калію (10 мг).

2. Приготування посівного матеріалу та культивування дріжджів.

Роботу проводять із дріжджами роду *Saccharomyces cerevisiae*.

В якості посівного матеріалу використовують дріжджі, що були пересіяні з вихідної культури на скошеному сусли-агарі у пробірку з 15 мл рідкого сусли та вирощені добу при $t=28^{\circ}\text{C}$. Перед початком роботи колбу з 150 мл сусли нагрівають на водяній бані до температури культивування дріжджів (30°C) і вносять посівний матеріал у кількості 1% (об'ємний).

Для визначення відсотка життєздатних клітин з дослідної колби готують мазок, на який наноситься метиленова синь. Препарат накривається покривним склом і в декількох полях зору підраховується кількість незабарвлених (живих) і забарвлених (мертвих) клітин. Розрахунок здійснюють за умови, що:

— загальна кількість клітин – 100 (%);

— кількість незабарвлених (живих) клітин – Х (%).

Ватну пробку в дослідній колбі у стерильних умовах замінюють на стерильну гумову з затвором Мейєля (затвор сконструйований таким чином, що пропускає CO_2 , який виділяється в ході бродіння, і затримує водяні пари). Після цього колбу зважують на технічних вагах і залишають у термостаті при 28°C . Зважування здійснюють щодня до кінця бродіння. Кінець бродіння встановлюють за сталою вагою дослідної колби. При зважуванні колби затвор не можна струшувати і збовтувати. Результати зважувань занотують у таблицю 3.1.

Заняття 2. Аналіз показників культуральної рідини

Після того, як вага колби залишається сталою протягом 2-х діб, проводять аналіз бродіння:

1. Вивчають морфологічну картину осаду, що утворився в процесі бродіння; підрахувати відсоток життєздатних клітин (див. заняття 1)

2. Визначають відсоток залишкових редукуючих цукрів методом Бертрана (див. заняття 1).

3. Визначають рН за допомогою рН-метру.

4. Визначають відсоток етилового спирту в культуральній рідині (після перегонки на 5 занятті)

5. Проводять якісну реакцію на етиловий спирт (після перегонки на 5 занятті).

Таблиця 3.1. Динаміка зміни ваги зброджуваного субстрату в процесі спиртового бродіння.

Час, год.	Вага колби, г	Кількість CO ₂			
		від початку досліду		за інтервал часу	
		г/150 мл	г/л	г/150 мл	г/л
0					
24					
48					
і т.д.					

Заняття 3, 4. Перегонка спирту

Перша перегонка. 100 мл культуральної рідини, звільненої від клітин декантацією, фільтруванням або центрифугуванням, переносять у круглодонну колбу, додають 50 мл дистильованої води і 0,1 мл концентрованої сірчаної кислоти (для зв'язування летючих основ). Колбу з'єднують з холодильником. Відгін проводять на пальнику або колбонагрівачі, слідкуючи за тим, щоб при нагріванні рідина в колбі бурхливо не кипіла (для чого на дно колби поміщають декілька шматочків порцеляни). Відгін, рівно 100 мл, збирають у мірну колбу.

Друга перегонка. Отримані 100 мл відгону переносять в круглодонну колбу, додають 0,1 мл концентрованої NaOH для зв'язування летючих кислот і альдегіду та відганяють 50 мл у мірну колбу.

Заняття 5.

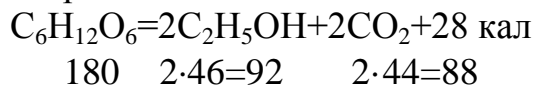
1. Кількісне визначення етилового спирту пікнометричним методом.

Визначають вагу сухого пікнометра на аналітичних вагах. Наповняють його дистильованою водою до мітки, старанно обтирають фільтрувальним папером і знову зважують. Виливають воду, пікнометр висушують у сушильній шафі. У сухий пікнометр наливають відгін тієї ж температури і зважують. Обчислюють вагу води і відгону. Розділивши вагу відгону на вагу води, визначають питому вагу відгону. Користуючись таблицею Генера (див. додаток Б), знаходять спочатку ваговий відсоток спирту у відгоні, а потім роблять перерахунок на весь об'єм культуральної рідини взятої для аналізу.

2. Теоретичний розрахунок виходу спирту за збродженням цукром і CO₂, що виділився.

За різницею ваги колби до і після досліду, тобто по кількості CO₂, що виділився, обчислюють кількість зброженого цукру і спирту, що утворився загалом.

З рівняння спиртового бродіння



впливає, що з 180г глюкози утворюються 92г етанолу і 88г CO₂.

Звідси:

$$\begin{aligned} \text{— зброджена глюкоза (г)} &= \frac{180 \cdot P}{88}; \\ \text{— спирт, що утворився, (г)} &= \frac{92 \cdot P}{88}; \end{aligned}$$

де P – кількість CO₂, що виділився.

Порівнюють дані теоретичного розрахунку з отриманими результатами.

3. Якісна реакція на етиловий спирт.

З відгону відбирають 10 мл, додають до нього 10 мл 20%-вого розчину соди і 0,1 г порошку металевого йоду. Нагрівають на водяній бані при 60°C до повного розчинення йоду. З охолодженого розчину випадають дрібні, у вигляді сніжинок і пластинок, кристали йодоформу (CHI₃) із характерним запахом. Отриманий в результаті реакції осад розглядають під мікроскопом. Мікроскопічну картину замальовують у протоколі.

Отримані результати занотовують у протоколі, зазначаючи показники всіх вимірів та наводячи усі розрахунки. Роблять висновок щодо різниці між практичним та теоретичним виходом спирту та збродженого цукру.

Контрольні питання та завдання:

1. Охарактеризуйте основні збудники спиртового бродіння.
2. Яким метаболічним шляхом дріжджі здійснюють збродження вуглеводів?
3. Що є основним продуктом бродіння при підвищенні рН до 8?
4. Чим пояснити період індукції на початку спиртового бродіння?
5. Яким чином утворюються вторинні продукти при спиртовому бродінні?
6. Які види спирту випускає промисловість?
7. Що слугує сировиною для отримання різних видів спиртів?
8. Де застосовуються харчовий та технічний спирт?
9. В чому суть визначення вмісту редукуючих цукрів методом Бертрана?
10. Як визначають відсоток життєздатних клітин у культуральній рідині?
11. Як пояснити різницю між теоретичним та практичним виходом спирту?

Лабораторна робота №4.

Дослідження молочнокислого бродіння (8 годин)

Мета роботи: виділити чисті культури молочнокислих мікроорганізмів, визначити основні показники середовища для молочнокислого бродіння, провести дослідне бродіння, визначити показники, що його характеризують.

Короткі теоретичні відомості

При молочнокислому бродінні, що викликається специфічною групою

бактерій, відбувається розпад глюкози до молочної кислоти.

Відомі три типи бродіння, що викликаються молочнокислими бактеріями:

- **гомоферментативне молочнокисле бродіння**, при якому з глюкози утворюється лише молочна кислота:



- **гетероферментативне молочнокисле бродіння**, коли з глюкози крім молочної кислоти утворюються етанол і диоксид вуглецю, або молочна кислота, ацетат та диоксид вуглецю:



- **біфідобродіння**, що викликається біфідобактеріями, при якому з глюкози утворюються ацетат і лактат:



В основі *гомоферментативного* молочнокислого бродіння лежать реакції гліколізу (шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса). Утворений в результаті піруват відновлюється до лактату воднем, що відщепився при дегідруванні гліцеральдегід-3-фосфату (рис. 4).

Утворення D(-) - , L(+) - або DL - форм молочної кислоти визначається наявністю у молочнокислих бактерій стереоспецифічних D- , L- або DL-лактатдегідрогеназ. Незначна частина пірувату піддається декарбоксилюванню, що призводить до утворення ацетату, етанолу і CO₂, а також ацетону.

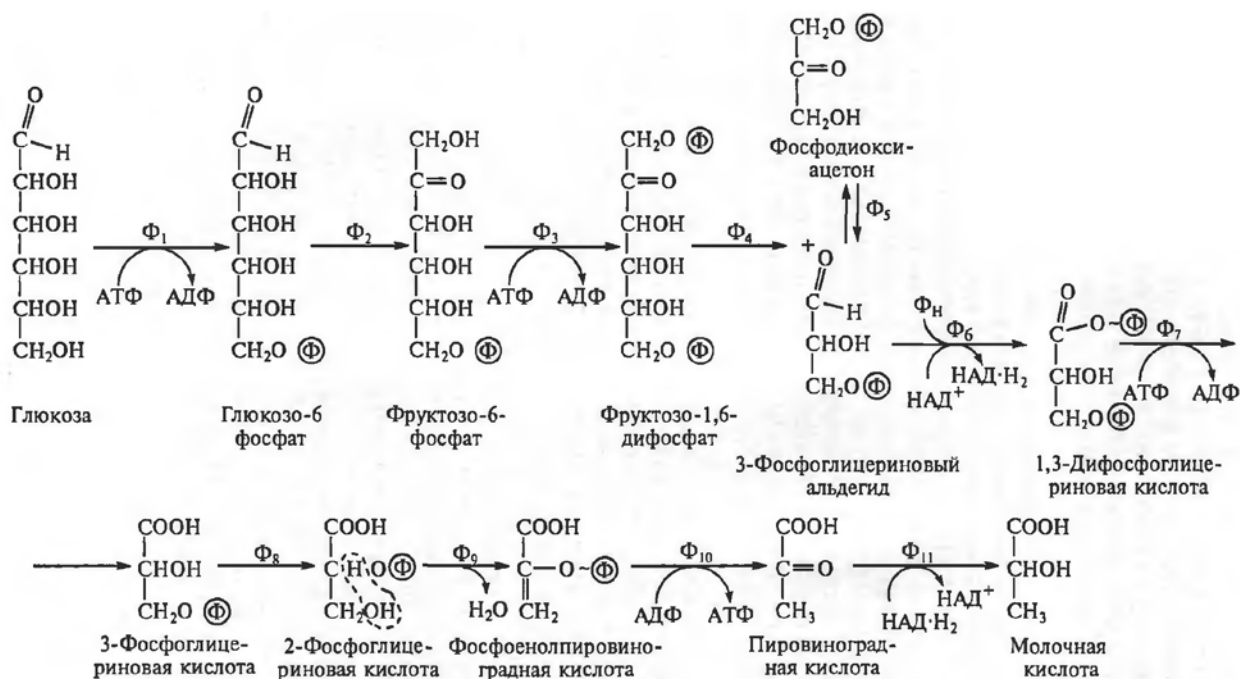


Рис. 4. Гомоферментативне молочнокисле бродіння:

Ф₁ – гексокиназа, Ф₂ – глюкозофосфатізомераза, Ф₃ – фосфофруктокіназа, Ф₄ – фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза, Ф₅ – триозофосфатізомераза, Ф₆ – 3-ФГА-дегідрогеназа, Ф₇ – фосфоглицераткіназа, Ф₈ – фосфоглицеромутаза, Ф₉ – енолаза, Ф₁₀ – піруваткіназа, Ф₁₁ – лактатдегідрогеназа

У гетероферментативних молочнокислих бактерій відсутні головні ферменти гліколізу – фруктозобісфосфатаальдолаза і тріозофосфатізомераза. Тому початкове перетворення глюкози йде у даних бактерій виключно по пентозофосфатному шляху до утворення рибулозо-5-фосфату (рис. 5). Останній під дією ферменту епімерази перетворюється на ксилулозо-5-фосфат.

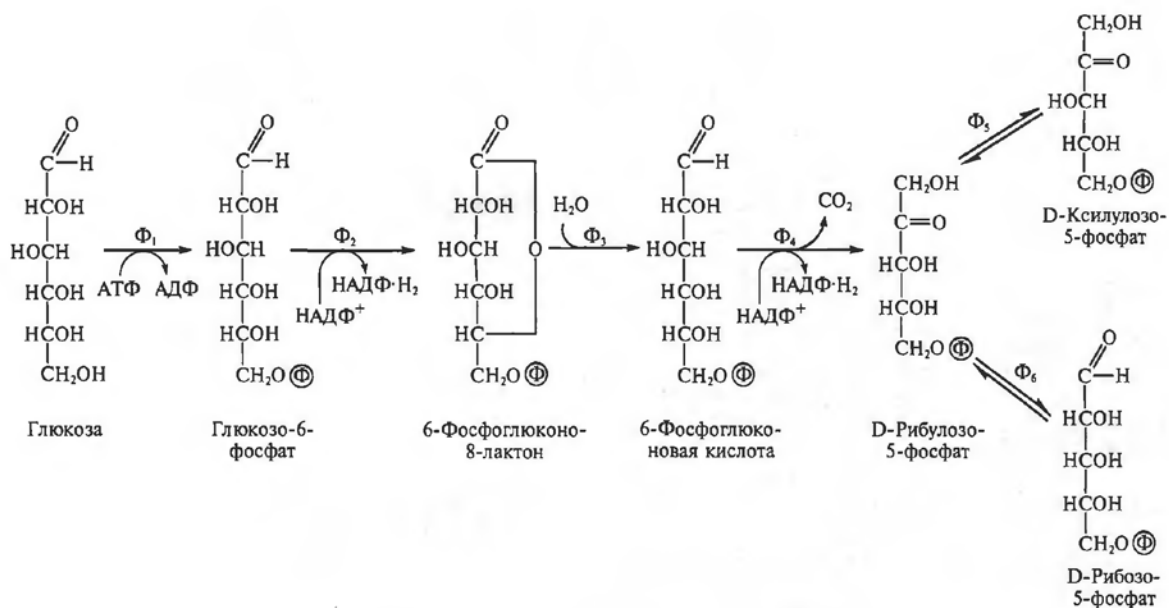


Рис. 5. Перші етапи гетероферментативного молочнокислого бродіння (окислювальний пентозофосфатний шлях):

Φ₁ – гексокіназа, Φ₂ – глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, Φ₃ – лактоназа, Φ₄ – фосфоглюконатдегідрогеназа (декарбоксилююча), Φ₅ – фосфопентозоепімераза, Φ₆ – фосфопентозоізомераза

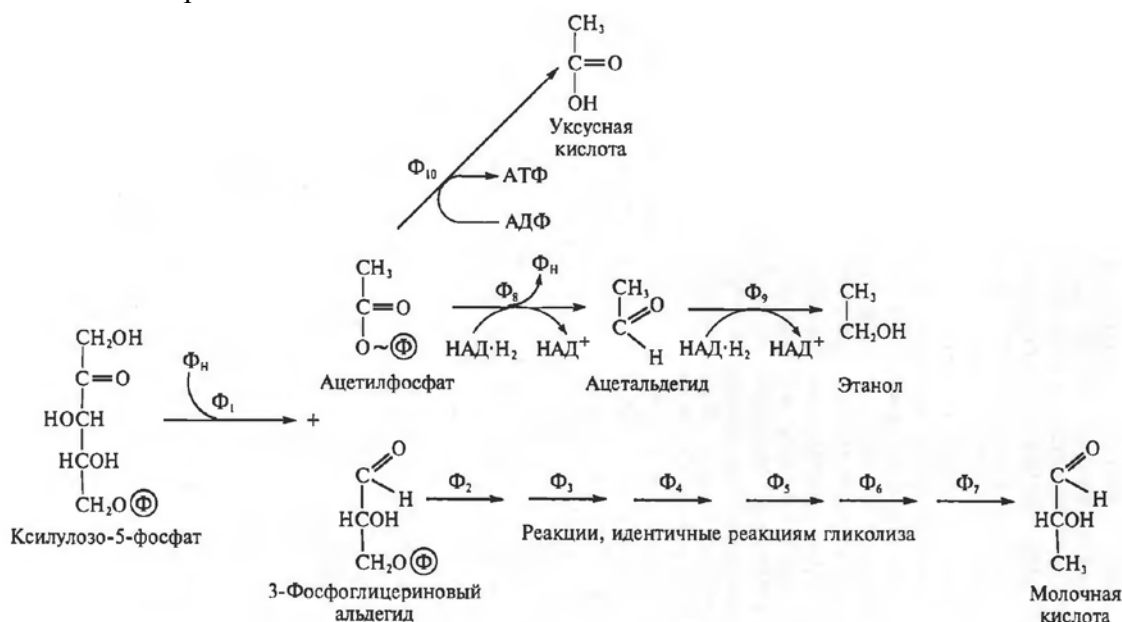


Рис. 6. Заключні етапи гетероферментативного молочнокислого бродіння:

Φ₁ – пентозофосфокеталаза, Φ₂ – 3-ФГА-дегідрогеназа, Φ₃ – фосфоглицераткіназа, Φ₄ – фосфоглицеромутаза, Φ₅ – енолаза, Φ₆ – піруваткіназа, Φ₇ – лактатдегідрогеназа, Φ₈ – ацетальдегіддегідрогеназа, Φ₉ – алкогольдегідрогеназа, Φ₁₀ – ацетаткіназа

Ксилулозо-5-фосфат в результаті реакції, що каталізується пентозофосфаткетотазою, розщеплюється на гліцеральдегід-3-фосфат і ацетилфосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на піруват, а потім в лактат, як і при гомоферментативному молочнокислому бродінні, а з ацетилфосфату утворюються або ацетат, або етанол (рис. 6).

Біфідобродіння здійснюється по пентозофосфатному шляху або по шляху Ентнера-Дудорова з кінцевими продуктами у вигляді ацетату і лактату.

За формою клітини молочнокислі бактерії є палички (довгі і короткі) і коки; які можуть утворювати парні або ланцюгові скупчення. Клітини грампозитивні, нерухомі, не утворюють спор (за винятком бактерій р. *Sporolactobacillus*). Молочнокислі бактерії – анаероби, але відносяться до групи аеротолерантних або факультативних анаеробів, тобто можуть рости при доступі кисню.

Молочнокислі бактерії володіють високою бродильною здатністю і відрізняються відсутністю більшості біосинтетичних шляхів. Це обумовлює високу вимогливість розглянутих бактерій до джерел живлення, яка задовольняється лише на таких середовищах, як тканини рослин, молоко, вміст шлунково-кишкового тракту людини та тварин. Джерелом енергії для цих бактерій служать головним чином моно- і дисахариди.

Молочнокислі бактерії вимогливі до джерел азотного харчування – вони використовують органічні форми азоту. Більшість молочнокислих бактерій можуть асимілювати білки, хоча краще розвиваються на амінокислотах, пептидах і поліпептидах.

Крім речовин, що містять вуглець і азот, молочнокислим бактеріям необхідні фосфор, калій, кальцій та інші елементи, які зазвичай надходять в середовище з різними мінеральними сполуками. Більшість молочнокислих бактерій потребує ростових речовин. Окремим бактеріям для розвитку потрібен рибофлавін.

Молочнокислі бактерії розвиваються в досить широкому діапазоні температур. Для більшості видів підходять температури від 7 до 42°C при оптимумі 30-40°C. Проте в природі зустрічаються форми, здатні розмножуватися в зоні більш низьких (мінімум 3°C) або більш високих (максимум 57°C) температур.

Більшість молочнокислих бактерій ростуть в діапазоні pH 5,5 - 8,8, проте краще розмножуються при нейтральній реакції середовища. У результаті життєдіяльності вони значно підкислюють поживне середовище, тому пристосувалися до існування в зоні досить високої кислотності середовища. Це кислотолюбиві організми, оптимум для них зазвичай становить pH 5,5-5,8 і менш, як правило, вони ростуть при pH 5, деякі при pH 2,9-3,2.

Кокові форми молочнокислих бактерій, які здійснюють **гомоферментативне бродіння**, представлені родами *Streptococcus* і *Pediococcus*.

Бактерії роду *Streptococcus* мають круглі або злегка овальні клітини діаметром 0,5 - 1 мкм, розташовані поодинокі, парами або в ланцюжках. Вони

широко поширені в природі на рослинах, у ґрунті, гної, молоці та інших субстратах. Бактерії роду *Streptococcus* використовуються у ряді харчових виробництв. До даного роду відносять види *S. lactis*, *S. lactis* var. *diacetylactis*, *S. cremoris*, *S. thermophilus*.

Представники роду *Pediococcus* – грампозитивні неспороутворюючі нерухомі коки, що розташовуються купками, тетрадами, парами або поодинокі. Оптимальне для видів роду значення рН 5. Бактерії схильні до анаеробних умов. Зустрічаються в рослинній сировині, що зброджується, – квашених овочах, силосі, а також в сирі, молоці, в травному тракті тварин і т.д. Серед видів роду найбільш цікаві *P. damnosus*, *P. acidilactici*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*.

Паличкоподібні бактерії, які здійснюють молочнокисле бродіння, відносяться роду *Lactobacillus*. Характеризуються значною різноманітністю форм від короткої кокоподібної до довгої ниткоподібної. Розташовуються поодинокі, парами або ланцюжками.

Бактерії цього роду виявляють в молочних, зернових і м'ясних продуктах, пиві, вині, соліннях й маринадах, у воді та стічних водах, а також в ротовій порожнині і кишковому тракті людини і тварин. Для *Lactobacillus* оптимум рН 5,5-5,8, але вони можуть розвиватися при рН 5 і нижче.

Серед **гомоферментативних молочнокислих паличок** можна виділити дві групи – *Thermobacterium* і *Streptobacterium*.

Перша група представлена організмами, які, як правило, ростуть при 45°C і вище, зазвичай не розвиваються при 20°C і ніколи не ростуть при 15°C. Це *L. delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* і *L. acidophilus*.

Представники другої групи при розвитку в молоці утворюють короткі ланцюжки. Це група менш активних молочнокислих паличок. Вони добре розвиваються при 15-38°C, оптимум для них становить 30°C. У молоці, молочних продуктах і на рослинах зазвичай виявляють кілька видів бактерій другої групи: *L. casei*, *L. xylosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*. *L. casei* відіграє важливу роль у дозріванні сирів. *L. plantarum* бере участь у молочнокислому бродінні при квашенні овочів і силосуванні.

Гетероферментативне молочнокисле бродіння здійснюють представники родів *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (підрид *Betabacterium*), *Bifidobacterium*.

Бактерії роду *Leuconostoc* мають вигляд сферичних або частіше сочевицеподібних клітин. Клітини розташовуються поодинокі, парами або в коротких ланцюжках, купкоподібних скупчень не виявлено. Грампозитивні. Спор не утворюють. Факультативні анаероби, оптимум температури для них становить 20-30°C. На середовищах з сахарозою в цих організмів з'являється товста зовнішня оболонка з слизу або декстранів.

Види роду виявляються головним чином на рослинних матеріалах (іноді в молоці). *L. mesenteroides* і *L. dextranicum* беруть активну участь у зброджуванні вуглеводів при квашенні капусти і силосуванні. *L. dextranicum* і *L. cremoris* зброджують лимонну кислоту з утворенням діацетилу, тому вони можуть бути компонентами заквасок, застосовуваних у масло- і сироварінні.

Гетероферментативні лактобацили (бета-бактерії) – *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*. Зазвичай зустрічаються на рослинах, виявлені в хлібних заквасках.

До роду *Bifidobacterium* відносяться бактерії, що мають нерухомі, прямі або розгалужені палички, клітини роздвоєної V-форми, булавовидної або лопатоподібної форми. Неутворюють спор, грампозитивні. Строгі анаероби, не переносять присутності O₂. Оптимум температури для них становить 36-38°C. Відомо більше 20 видів біфідобактерій; типовий представник роду *B. bifidum*.

Біфідобактерії – мешканці кишечника людини, тварин, комах і т.п. Встановлено, що представники роду *Bifidobacterium* складають від 50 до 90 % мікробного вмісту фекалій людини.

Молочнокислі бактерії мають величезне практичне значення. Їх широко використовують при виготовленні кисломолочних, квашених продуктів, сирів, кисловершкового масла тощо.

У виробничих умовах кисломолочні продукти готують, заражаючи молоко відповідними чистими культурами бактерій. З цією метою використовують молочнокислий стрептокок (*S. lactis*), болгарську паличку (*L. bulgaricus*), ацидофільну паличку (*L. acidophilus*) та ін.

Ряд молочнокислих продуктів готують, використовуючи закваску, яка містить симбіотичні комплекси мікроорганізмів. Наприклад, для приготування кефіру в молоко вносять так звані кефірні зерна, вони містять *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, дріжджі *Saccharomyces kefir*, які зброджують лактозу. Продуктами бродіння виступають молочна кислота і спирт.

Lactobacillus plantarum і *L. coryneformis* використовують в хлібопеченні.

Деякі лактобацили і стрептококи застосовуються при виготовленні сирокоччених ковбас. Вони знижують рН середовища за рахунок утворення лактату, тим самим оберігаючи від псування ковбаси, які за технологією не піддаються варінню (салями, сервелат та ін.).

Молочнокислі бактерії приймають участь у квашенні овочів та силосуванні кормів, що зводяться головним чином до молочнокислого бродіння субстратів.

Молочнокисле бродіння, що здійснюється *L. delbrueckii*, лежить в основі отримання молочної кислоти.

Для отримання декстранів використовують штами *Leuconoctoc mesenteroides*.

Завдання до лабораторної роботи:

1. Виділити чисті культури молочнокислих бактерій.
2. Поставити дослідне бродіння.
3. Провести аналіз молочнокислого бродіння.
4. Занести в протокол відомості про мікрофлору молока.
5. Занотувати в протокол морфологічні та біохімічні особливості мікроорганізмів, збудників молочнокислого бродіння. Особливості гомо- та гетероферментативного молочнокислого бродіння. Практичне значення молочнокислого бродіння та його збудників.

Хід роботи

Заняття 1. Отримання молочнокислих бактерій (виконується вдома). Вивчення морфології клітин та аналіз середовища

Отримання молочнокислих бактерій. Для виділення молочнокислих бактерій використовують метод збагачення. Свіже молоко наливають у стерильні пробірки і залишають при $t=30^{\circ}\text{C}$ для розвитку бактерій протягом 48 годин. Ведуть щоденні спостереження. Для подальших досліджень відбирають пробірки з молоком, у яких утворився щільний згусток раніш, ніж в інших пробірках.

Вивчення морфології клітин. Готують мазок із сироватки зсілого молока, сушать, фіксують над полум'ям пальника. Жир знімають, поклавши фільтрувальний папір на гарячий мазок. Мазок фарбують метиленовою синю (барвник добре забарвлює мікроорганізми і слабо – казеїн молока), мікроскопують і замальовують в протоколі.

В якості посівного матеріалу використовують пробірки з молоком, у яких щільний згусток утворився раніш, та мікробіологічна картина яких складається переважно з однорідної культури паличок або стрептококів.

Аналіз середовища. При постановці бродіння кращим живильним середовищем для розвитку молочнокислих бактерій є молоко. У стерильні колби Ерленмейера розливають по 100 мл знежиреного молока. У молоці визначають:

- а) вміст цукру (за методом Бертрана, див. лабораторну роботу №3);
- б) кислотність, що титрується, у градусах Тернера.

Середовище стерилізують при 0,5 атм 30 хвилин.

Визначення кислотності, що титрується, в градусах Тернера. Кислотність молока за Тернером визначають титруванням децінормальним розчином лугу з індикатором фенолфталеїном. Для титрування у конічну колбу вносять 10 мл молока, розбавляють 20 мл дистильованої води і додають 2-3 краплі 1%-вого спиртового розчину фенолфталеїну. Суміш старанно перемішують і титрують при постійному збовтуванні 0,1 н розчином їдкого натрію (або калію) до рожевого забарвлення, що не змінюється протягом 1 хвилини.

Кількість 0,1 н розчину лугу, витрачену на титрування, множать на 10 і одержують градуси кислотності Тернера, що показують кількість (мл) 0,1 н їдкого натрію, що було витрачено на нейтралізацію 100 мл молока. 1° Тернера відповідає 9 мг молочної кислоти.

Постановка бродіння. Після аналізу поживного середовища його засівають культурою молочнокислих бактерій, поміщають у термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$ на 2 доби.

Заняття 2. Аналіз бродіння

По закінченні бродіння у збродженому молоці визначають:

- 1) мікроскопічну картину збродженого молока (замальовують);

- 2) вміст остаточного цукру (за методом Бертрана, див. лабораторну роботу №3);
- 3) кислотність, що титрується, за Тернером; якщо кислотність досягає 80-100°Т, то бродіння пройшло добре;
- 4) якісні реакції на молочну кислоту (заняття 3 та 4).

Заняття 3. Якісні реакції на молочну кислоту.

1. Переведення молочної кислоти в альдегід. Молочнокислий затор звільняють від осаду, фільтрують через паперовий складчастий фільтр або центрифугують, і супернатант у кількості 5-7 мл вносять у 100-мілілітрову конічну колбу, додають туди 1 мл 10%-вого розчину сірчаної кислоти і нагрівають до кипіння. Додають краплями 2%-вий розчин KMnO_4 . Молочна кислота переходить в оцтовий альдегід. Останній виявляють за допомогою фільтрувального паперу, просоченого аміачним розчином азотнокислого срібла. Для цього фільтрувальним папером покривають шийку колби, у якій проводять визначення: від дії оцтового альдегіду на аміачний розчин срібла папірець чорніє.

2. Проба з фенолом. Реактив готують шляхом змішування 5%-вих розчинів карболової кислоти і хлорного заліза у співвідношенні 1:2 (розчини розбавляють подвійною кількістю води). В присутності молочної кислоти початковий аметистово-синій колір переходить у солом'яно-жовтий, що дає молочнокисле залізо.

3. Підготовка до проведення хроматографічного методу виявлення молочної кислоти. Для видалення білків супернатант обробляють 10%-вим розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) у співвідношенні 1:1. Рідину від білків, що випали, звільняють центрифугуванням. Центрифугують протягом 10 хв. при 3000 об./хв. Фугат зливають з осаду і нейтралізують 0,1 н розчином їдкового луку до рН 7,0 за індикаторним папером. 10 мл отриманої рідини випарюють у порцелянових чашках на водяній бані до 1 мл. Сконцентрований фільтрат використовують для аналізу.

Заняття 4. Хроматографічний метод виявлення молочної кислоти

Приготування розчинників, заповнення хроматографічної камери, безпосередньо постановку хроматограми, висушування та проявлення здійснюють у витяжній шафі.

Постановка хроматограми. Для постановки хроматограми використовують наступні системи розчинників:

бутанол - 17 частин, мурашина кислота - 1 частина, бідистилят - 7 частин;
бутанол - 4 частини, оцтова кислота - 1 частина, бідистилят - 5 частин.

Розчинники наливають заздалегідь (за 5-6 годин) у хроматографічні камери для їхнього насичення.

На смужки хроматографічного паперу розміром $2 \times 45-50 \text{ см}^2$ типу «швидкий» наносять на стартову лінію мікропіпеткою досліджуваний розчин у кількості 0,01 - 0,05 мл. Стартова лінія відкреслюється тонко заточеним

простим олівцем на відстані 4 см від нижнього кінця смужки при лінії занурення, рівній 2 см. Лінія фронту дорівнює 30 см.

Одночасно ставиться контрольна хроматограма, на неї наносять стандартний розчин молочної кислоти (100 мг молочної кислоти розчиняють у 10 мл бідистильованої води).

Хроматограму знімають, коли фронт розчинника піднімається на 30 см вище лінії старту, висушують на повітрі і проявляють бромфеноловим синім (0,04%).

Приготування проявника. 40 мг бромфенолового синього розчиняють у 250 мл 96° етилового спирту (0,04%). Індикатор підкислюють 10%-вим розчином лимонної кислоти до рН 5,6.

Проявлення хроматограми. Для проявлення хроматограму або обприскують проявником з пульверизатору, або проводять крізь розчин проявника, який заздалегідь налитий у кювету. При проявленні хроматограм молочна кислота виявляється у вигляді жовтих плям на блакитному фоні. Надалі хроматограму підсушують, виявлені плями обводять простим олівцем і розраховують R_f для досліджуваного зразка і для контролю. Для розрахунку рухомості речовини (R_f) на папері вимірюють відстань (x) від старту, куди наносили досліджуваний зразок, до середини його плями та відстань (x_f) від старту до фронту розчинника і підставляють у формулу:

$$R_f = \frac{x}{x_f}.$$

Результати наводять у протоколі, зазначаючи показники всіх вимірів та наводячи всі розрахунки.

Контрольні питання та завдання:

1. Які типи бродіння викликаються молочнокислими бактеріями?
2. У чому особливості гомоферментативного молочнокислого бродіння?
3. Які ферменти відсутні у гетероферментативних молочнокислих бактерій?
4. У чому особливості гетероферментативного молочнокислого бродіння?
5. Чим обумовлена висока вимогливість молочнокислих бактерій до джерел живлення?
6. Яких джерел азотного та вуглецевого живлення вимагають молочнокислі бактерії?
7. За яких температур здатні розвиватися молочнокислі бактерії? Які температури є оптимальними?
8. За яких значень рН здатні розвиватись молочнокислі бактерії? Які значення є оптимальними?
9. Дайте характеристику кокових форм молочнокислих бактерій, що здійснюють гомоферментативне бродіння.
10. Дайте характеристику паличкоподібних молочнокислих бактерій, що здійснюють гомоферментативне бродіння.
11. Дайте характеристику молочнокислих бактерій, що здійснюють гетероферментативне бродіння.
12. Практичне значення молочнокислого бродіння та його збудників.

Лабораторна робота №5. Дослідження оцтовокислого бродіння (6 годин)

Мета роботи: виділити чисті культури оцтовокислих мікроорганізмів, визначити основні показники середовища для оцтовокислого бродіння, провести дослідне бродіння, визначити показники, що його характеризують.

Короткі теоретичні відомості

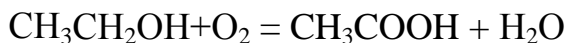
Етиловий спирт окислюється до оцтової кислоти під впливом оцтовокислих бактерій родів *Gluconobacter* і *Acetobacter*. Це грамнегативні хемоорганогетеротрофні, ендоспор не утворюють, паличкоподібні організми, рухомі або нерухомі.

Оцтовокислі бактерії зазначених родів різняться між собою за характером джгутикування. У представників роду *Gluconobacter* клітини рухаються за допомогою трьох – восьми полярних джгутиків, рідко одного, є і нерухомі форми. Для бактерій роду *Acetobacter* характерно перитрихіальне джгутикування, але також серед них є і нерухомі види.

Оцтовокислі бактерії – строгі аероби, тому вони розвиваються тільки на поверхні середовища з утворенням плівок. Одні види організмів утворюють тонкі плівки, що складаються з одного шару клітин, у інших плівки більш товсті, іноді нагадують цигарковий папір. Окремі види мають слизові, товсті плівки. Так представник роду *Acetobacter* – *A. xylinum* при зростанні на середовищі з глюкозою або іншими джерелами вуглецю здатний формувати слизову плівку, що складається з чистої целюлози та бактеріальних клітин. Целюлозні фібрили представляють собою пухку масу, що оточує клітини. У культурі цей організм утворює плівку товщиною 1 см і більше.

Оцтовокислі бактерії відрізняються високою стійкістю до кислот (можуть рости в середовищі з початковим рН 4, при оптимумі рН 5-6).

Характерна особливість оцтовокислих бактерій – здатність перетворювати етиловий спирт в оцтову кислоту в процесі неповного окиснення:



Оцтовокислі бактерії використовують для виробництва харчового оцту з вина та спирту. Два роди оцтовокислих бактерій розрізняють за ступенем окислення органічних субстратів. Так, бактерії роду *Acetobacter* (*A. peroxydans*) сприяють накопиченню оцтової кислоти як проміжного продукту та подальшому її окисненню до CO_2 і H_2O (бактерії ще називають переокислювачами). Види роду *Gluconobacter* (*G. oxydans*) викликають утворення оцтової кислоти як кінцевого продукту реакції, який зазвичай не піддається подальшому окисненню (бактерії називають недоокислювачами). Здатність видів роду *Acetobacter* окисляти оцтову кислоту до CO_2 пояснюється наявністю в їх обміні речовин циклу трикарбонових кислот. Оцтовокислі бактерії здатні окисляти не тільки етиловий, але й інші спирти, у тому числі

аліфатичні багатоатомні.

Крім зазначених окисних процесів, оцтовокислі бактерії можуть викликати окислення сорбіту до сорбози, маніту до фруктози, глюкози до глюконової кислоти, глюконової кислоти до кетоглюконових кислот. Перераховані перетворення здійснюються за пентозофосфатним шляхом представниками роду *Gluconobacter*. Особливий інтерес викликає окислення оцтовокислими бактеріями D-сорбіту до L-сорбози. Остання потрібна у великих кількостях для синтезу вітаміну C.

Завдання до лабораторної роботи:

1. Виділити чисту культуру оцтовокислих бактерій.
2. Поставити дослідне бродіння.
3. Провести аналіз оцтовокислого бродіння.
4. Занотувати в протокол особливості морфології та фізіології оцтовокислих бактерій. Занести в протокол схему оцтовокислого бродіння. Використання оцтовокислого бродіння у народному господарстві.

Хід роботи

Заняття 1. Виділення чистої культури

Отримання накопичувальної культури. Збудники оцтовокислого бродіння – оцтовокислі палички виділяють зі слабоалкогольних напоїв, що довільно заграли – пива, неміцного виноградного вина.

Для виділення чистої культури бактерій збудників оцтовокислого бродіння у колбу Ерленмейєра наливають тонким шаром 50мл пива, підкислюють, додаючи 5-10 мл столового оцту, і залишають стояти при температурі 25-30°C.

Через 2 доби на поверхні пива з'являється сірувато-біла плівка оцтовокислих бактерій. Плівку досліджують під мікроскопом. Для цього в краплю 1%-вого розчину йоду на предметному склі вносять шматочок плівки оцтовокислих бактерій, накривають препарат покривним склом і роздивляються його під мікроскопом.

У *Acetobacter pasteurianum* і *A. kutzianum* оболонка клітин стає синьою під дією на них йоду. Посиніння плівки можна спостерігати неозброєним оком, якщо в порцелянову чашку, у якій знаходиться шматок плівки, налити 1%-вий розчин йоду. Інші бактерії *A. Acet* та *A. anans* посиніння не дають і забарвлюються йодом у жовтий колір.

Мікроскопічну картинку замальовують у протокол.

Отримання чистої культури. Виділення оцтовокислих бактерій у чисту культуру здійснюють на 6°Б сусло-агарі з 0,5% ММА з додаванням до нього після стерилізації 3% етилового спирту. На поживний агар наносять краплю суспензії бактерій, розтирають шпателем по всій поверхні, а потім цим же шпателем, не обмиваючи його, засівають ще одну чашку.

Культивують при температурі 35-37°C. За 2-3 доби на чашках виростають колонії. З колоній, що дали найбільші зони просвітління середовища, готують

мазки, фарбують фуксином, переглядають у мікроскопі і роблять пересіви у свіже середовище (6°Б сусло + 5% етилового спирту).

Заняття 2. Постановка оцтовокислого бродіння.

Засів поживного середовища. У конічну колбу наливають 100 мл 6°Б сусла, стерилізують при 0,5атм. 20 хвилин. Потім в охолоджене середовище вносять 5% 96° етилового спирту і засівають культурою бактерій із розрахунку 1%. Усе старанно перемішують, стерильно відбирають 1 мл засіяного затору для визначення початкової кислотності.

Визначення кислотності затору. 1 мл затору доводять дистильованою водою до 10 мл і титрують 0,1 н розчином їдкого натру при додаванні 1-2 крапель 1%-вого спиртового розчину фенолфталеїну до стійкого протягом 1 хвилини рожевого забарвлення. Розраховують початкову кислотність.

Засіяне середовище поміщають у термостат при $t=35-37^{\circ}\text{C}$. Ведуть щодня облік наростаючої кислотності.

У дослідну колбу через 48 годин після засіву живильного середовища культурою вносять 1 мл 96% етилового спирту. Цю процедуру повторюють через день до кінця бродіння. Кінець бродіння визначають за припиненням наростання кислотності.

За час культивування необхідно ретельно вести облік кількості спирту, що додається, а також кількості культуральної рідини, що відбирається для титрування (для розрахунків).

Заняття 3. Аналіз оцтовокислого бродіння

При встановленні сталої кислотності в заторі приступають до аналізу результатів бродіння:

а) визначають залишковий спирт методом окислювання хромовокислим калієм;

б) проводять якісні реакції на оцтову кислоту.

Визначення залишкового спирт методом окислювання хромовокислим калієм.

Приготування шкали для визначення залишкового спирту. Готують пробірки, однакові за розміром і відтінком скла. В усі пробірки наливають по 1 мл концентрованої H_2SO_4 , по 1 мл етилового спирту (різної концентрації в 1-у пробірку – 1%-вий розчин спирту, у 2-у – 2%-вий розчин спирту, у 3-ю – 3%-вий розчин спирту і т.д.), потім в усі пробірки доливають по 0,6 мл 20%-вого розчину $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ і по 5 мл дистильованої води. В залежності від концентрації спирту інтенсивність забарвлення рідини в пробірках буде різноманітна: від блакитнувато-зеленого до жовто-жовтогарячого.

Визначення залишкового спирту. Затор фільтрують через паперовий фільтр, відбирають 1 мл, додають 1 мл концентрованої H_2SO_4 , 0,6мл 20 %-вого розчину $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ і 5 мл дистильованої води і порівнюють із стандартною шкалою, визначаючи процент вмісту спирту у заторі.

Якісні реакції на оцтову кислоту. Беруть 50 мл затору і відганяють 40 мл. До 5 мл відгону додають 2 мл 96%-вого етилового спирту і 2мл концентрованої H_2SO_4 ; нагрівають у полум'ї пальника. При нагріванні

виділяється оцтово-етилловий ефір, або грушева есенція.

Результати досліджень занотовують у протоколі.

Контрольні питання та завдання:

1. Які бактерії здатні окислювати етиловий спирт до оцтової кислоти?
2. Чим відрізняються оцтовокислі бактерії родів *Gluconobacter* і *Acetobacter*?
3. Дайте характеристику оцтовокислим бактеріям?
4. Чому бактерії роду *Acetobacter* називають переокислювачами, а бактерії роду *Gluconobacter* – недоокислювачами?
5. Які ще процеси окислення можуть проводити оцтовокислі бактерії?
6. У чому особливість представника роду *Acetobacter* – *A. xylinum*?
7. Якісні реакції на оцтову кислоту.

Рекомендована література

1. Биотехнология: Учебн. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н.С.Егорова. Кн. 6: Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. и др. – М.: Высш. шк, 1987. – 143 с.
2. Биотехнология биологически активных веществ. Учебн. пособие для студентов высших учебных заведений / Под ред. И.М. Грачевой, Л.А. Ивановой. – М.: Из-во «Элевар», 2006. – 453 с.
3. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під ред. В.Г. Герасименка. – К.: Фірма «Інкос», 2006. – 647 с.
4. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: Учебное пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
6. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая пищевая промышленность, 1982. – 262 с.
7. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н.Блохина и др.; Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989. – 688 с.
8. Биотехнология: Учебн. Пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н.С.Егорова. В.Д.Самуилова. Кн. 5: Производство белковых веществ / Быков В.А., Манаков М.Н., Панфилов В.И. и др. – М.: Высш. шк, 1987. – 142 с.
9. Гусев М.В., Минаев Л.А. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов – 4-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
10. Мальцев П.М. Технология бродильных производств. – М.: Легкая пищевая промышленность, 1980. – 560с.
11. Никитин Г.А. Биохимические основы микробиологических производств: Учебное пособие. – К.: Вища школа, 1992. – 319 с.
12. Смирнов В.А. Пищевые кислоты (лимонная, молочная, винная). – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. – 264 с.

Додаток А

Визначення вмісту цукрів за кількістю відновленої міді за методом Бертрана.

Кількість цукру, мг	Кількість відновленої міді, мг			Кількість цукру, мг	Кількість відновленої міді, мг		
	глюкозою	інвертованою сахарозою	мальтозою		глюкозою	інвертованою сахарозою	мальтозою
10	20,4	20,6	11,2	56	105,8	105,7	61,4
11	22,4	22,6	12,3	57	107,6	107,4	62,5
12	24,3	24,6	13,4	58	109,3	109,2	63,5
13	26,3	26,5	14,5	59	111,1	110,9	64,6
14	28,3	28,5	15,6	60	112,8	112,6	65,7
15	30,2	30,5	16,7	61	114,5	114,3	66,8
16	32,2	32,5	17,8	62	116,2	115,9	67,9
17	34,2	34,5	18,9	63	117,9	117,6	68,9
18	36,2	36,4	20,0	64	119,6	119,2	70,0
19	38,1	38,4	21,1	65	121,3	120,9	71,1
20	40,1	40,4	22,2	66	123,0	122,6	72,2
21	42,0	42,3	23,3	67	124,7	124,2	73,3
22	43,9	44,2	24,4	68	126,4	125,9	74,3
23	45,8	46,1	25,5	69	128,1	127,5	75,4
24	47,7	48,0	26,6	70	129,8	129,2	76,5
25	49,6	49,8	27,7	71	131,4	130,8	77,6
26	51,5	51,7	28,9	72	133,1	132,4	78,6
27	53,4	53,6	30,0	73	134,7	134,0	79,7
28	55,3	55,5	31,1	74	136,3	135,6	80,8
29	57,2	57,4	32,2	75	137,9	137,2	81,8
30	59,1	59,3	33,3	76	139,6	138,9	82,9
31	60,9	61,1	34,4	77	141,2	140,5	84,0
32	62,8	63,0	35,5	78	142,8	142,1	85,1
33	64,6	64,8	36,5	79	144,5	143,7	86,1
34	66,5	66,7	37,6	80	146,1	145,3	87,2
35	68,3	68,5	38,7	81	147,7	146,9	88,3
36	70,1	70,3	39,8	82	149,3	148,5	89,4
37	72,0	72,2	40,9	83	150,9	150,0	90,4
38	73,8	74,0	41,9	84	152,5	151,6	91,5
39	75,7	75,9	43,0	85	154,0	153,2	92,6
40	77,5	77,7	44,1	86	155,6	154,8	93,7
41	79,3	79,5	45,2	87	157,2	156,4	94,8
42	81,1	81,2	46,3	88	158,8	157,9	95,8
43	82,9	83,0	47,4	89	160,4	159,5	96,9
44	84,7	84,8	48,5	90	162,0	161,1	98,0
45	86,4	86,5	49,5	91	163,6	162,6	99,0
46	88,2	88,3	50,5	92	165,2	164,2	100,1
47	90,0	90,1	51,7	93	166,7	165,7	101,1
48	91,8	91,9	52,8	94	168,8	167,3	102,2
49	93,6	93,6	53,9	95	169,9	168,8	103,2
50	95,4	95,4	55,0	96	171,5	170,3	104,2
51	97,1	97,1	56,1	97	173,1	171,9	105,3
52	98,9	98,9	57,1	98	174,6	173,4	106,3
53	100,6	100,6	58,2	99	176,2	175,0	107,4
54	102,3	102,3	59,3	100	177,8	176,5	108,4
55	104,1	104,0	60,3				

Додаток Б

Відносна густина водно-спиртових розчинів, що містять різну кількість спирту у об'ємних, масових та молярних відсотках.

d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині			d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині		
	об. %	мас. %	мол. %		об. %	мас. %	мол. %
1,0000	0,00	0,00	0,00	0,9956	3,00	2,38	0,94
0,9999	0,07	0,06	0,02	5	08	45	97
8	13	10	4	4	15	50	99
7	20	16	6	3	22	56	1,02
6	27	21	8	2	29	61	04
5	34	27	11	1	36	67	06
4	40	32	12	0	43	73	08
3	47	37	16	0,9949	50	78	11
2	54	43	17	8	57	84	13
1	61	48	19	7	64	89	15
0	67	53	21	6	71	95	17
0,9989	0,74	0,59	0,23	5	78	3,01	20
8	81	64	25	4	85	06	22
7	88	70	27	3	92	12	24
6	94	74	29	2	4,00	18	27
5	1,01	80	31	1	07	24	29
4	08	86	34	0	14	29	31
3	15	91	36	0,9939	22	36	34
2	21	96	38	8	29	41	36
1	28	1,01	40	7	36	47	38
0	35	06	42	6	43	53	41
0,9979	42	13	44	5	51	59	43
8	49	18	46	4	58	64	46
7	56	24	49	3	65	70	48
6	62	28	51	2	72	76	50
5	69	34	53	1	80	82	53
4	76	40	55	0	87	88	55
3	83	45	57	0,9929	94	93	57
2	90	51	59	8	5,01	99	60
1	97	56	62	7	09	4,05	62
0	2,03	61	64	6	16	11	65
0,9969	10	67	66	5	24	17	67
8	17	72	68	4	32	24	70
7	24	78	70	3	39	29	72
6	31	83	72	2	47	36	75
5	38	89	75	1	54	42	77
4	44	94	77	0	62	48	79
3	51	99	79	0,9919	69	54	82
2	58	2,05	81	8	77	60	85
1	66	11	84	7	84	66	87
0	72	16	85	6	92	72	90
0,9959	79	22	88	5	6,00	78	93
8	86	27	90	4	07	84	95
7	93	33	92	3	15	91	98

d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині			d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині		
	об. %	мас. %	мол. %		об. %	мас. %	мол. %
0,9912	6,22	4,96	2,00	0,9863	10,17	8,15	3,35
1	30	5,03	03	2	26	23	38
0	38	09	05	1	34	29	41
0,9909	46	15	08	0	42	36	44
8	53	21	10	0,9859	51	43	47
7	61	28	13	8	59	49	50
6	69	34	16	7	67	56	53
5	77	40	18	6	76	63	56
4	84	46	21	5	84	69	59
3	92	52	23	4	92	76	62
2	7,00	59	26	3	11,00	83	64
1	08	65	29	2	09	90	68
0	16	71	31	1	17	97	70
0,9899	24	78	34	0	26	9,04	74
8	31	84	37	0,9849	34	10	76
7	39	90	39	8	43	18	80
6	47	97	42	7	51	24	83
5	55	6,03	45	6	60	32	86
4	63	10	47	5	68	38	89
3	71	16	50	4	77	45	92
2	79	23	53	3	85	52	95
1	87	29	56	2	94	59	98
0	95	36	58	1	12,02	66	4,01
0,9889	8,03	42	61	0	11	73	04
8	12	49	64	0,9839	19	79	06
7	20	56	67	8	28	87	10
6	28	62	70	7	36	94	13
5	36	67	72	6	45	10,1	16
4	44	75	75	5	54	08	20
3	52	82	78	4	62	15	22
2	60	88	81	3	71	22	26
1	68	95	83	2	80	29	29
0	76	7,01	86	1	89	37	32
0,9879	85	08	89	0	97	43	35
8	93	14	92	0,9829	13,06	51	38
7	9,01	21	95	8	15	58	42
6	10	29	98	7	24	65	45
5	18	35	3,01	6	32	72	48
4	26	41	03	5	41	79	51
3	34	48	06	4	50	87	55
2	43	55	09	3	59	94	58
1	51	62	12	2	67	11,00	61
0	59	68	15	1	76	07	64
0,9869	68	7,76	18	0	85	15	67
8	76	82	21	0,9819	94	23	71
7	84	88	24	8	14,03	30	74
6	92	95	26	7	12	37	77
5	10,01	8,02	30	6	21	45	81
4	09	09	32	5	30	52	84

d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині			d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині		
	об. %	мас. %	мол. %		об. %	мас. %	мол. %
0,9814	14,39	11,59	4,87	0,9765	18,88	15,29	6,58
3	48	67	91	4	98	37	62
2	56	73	94	3	19,08	45	66
1	65	81	97	2	17	53	70
0	74	88	5,00	1	26	60	73
0,9809	83	95	04	0	36	68	77
8	92	12,03	07	0,9759	46	77	81
7	96	10	10	8	55	84	85
6	15,10	17	14	7	65	92	88
5	19	25	17	6	74	16,00	92
4	28	32	20	5	84	08	96
3	37	40	24	4	93	16	7,00
2	46	47	27	3	20,02	23	04
1	55	54	31	2	12	31	08
0	64	62	24	1	21	39	11
0,9799	73	69	37	0	31	47	15
8	82	77	41	0,9749	40	54	19
7	91	84	44	8	50	62	23
6	16,00	91	48	7	59	70	26
5	09	99	51	6	68	78	30
4	18	13,06	54	5	78	86	34
3	27	14	58	4	87	93	38
2	37	22	62	3	97	17,02	42
1	45	28	65	2	21,06	09	45
0	55	37	68	1	15	17	49
0,9789	64	44	72	0	24	24	53
8	73	51	75	0,9739	33	32	56
7	82	59	79	8	42	39	60
6	91	66	82	7	52	47	64
5	17,01	74	86	6	61	54	68
4	10	82	89	5	70	62	71
3	19	89	93	4	79	70	75
2	28	97	96	3	88	77	79
1	38	14,05	6,00	2	98	86	83
0	47	12	04	1	22,07	93	86
0,9779	56	20	07	0	16	18,01	90
8	66	28	11	0,9729	25	08	94
7	75	36	14	8	34	16	98
6	85	44	18	7	43	23	8,01
5	94	51	22	6	52	31	05
4	18,03	59	25	5	61	38	09
3	13	67	29	4	70	46	12
2	22	74	33	3	80	54	16
1	32	82	37	2	89	62	20
0	41	90	40	1	98	69	24
0,9769	50	97	44	0	23,07	77	28
8	60	15,06	48	0,9719	16	84	31
7	69	13	51	8	25	92	35
6	79	21	55	7	34	99	39

d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині			d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині		
	об. %	мас. %	мол. %		об. %	мас. %	мол. %
0,9716	23,43	19,07	8,43	0,9667	27,72	22,67	10,28
5	52	14	46	6	80	74	31
4	61	22	50	5	88	81	35
3	70	29	54	4	97	88	39
2	79	37	58	3	28,06	96	43
1	88	44	62	2	14	23,03	46
0	97	52	65	1	22	09	50
0,9709	24,06	59	69	0	31	17	54
8	15	67	73	0,9659	39	24	58
7	24	74	77	8	47	31	61
6	33	82	81	7	56	38	65
5	42	89	84	6	64	45	69
4	51	97	88	5	72	52	72
3	60	20,04	92	4	81	60	76
2	69	12	96	3	89	66	80
1	77	19	99	2	98	74	84
0	86	26	9,03	1	29,06	81	88
0,9699	95	34	07	0	14	88	91
8	25,04	41	11	0,9649	23	95	96
7	13	49	15	8	31	24,02	99
6	22	57	18	7	39	09	11,03
5	30	63	22	6	47	15	06
4	39	71	26	5	56	23	11
3	48	78	30	4	64	30	14
2	57	86	33	3	72	37	18
1	66	94	37	2	80	43	22
0	74	21,00	41	1	88	50	25
0,9689	83	08	45	0	96	57	29
8	92	15	49	0,9639	30,04	64	33
7	26,00	22	52	8	13	72	37
6	09	30	56	7	21	78	40
5	18	37	60	6	29	85	44
4	26	44	63	5	37	92	48
3	35	52	67	4	45	99	52
2	43	58	71	3	53	25,06	55
1	52	66	75	2	61	13	59
0	60	73	78	1	69	20	63
0,9679	69	80	82	0	77	26	66
8	78	88	86	0,9629	84	32	70
7	86	95	90	8	92	39	73
6	95	22,02	94	7	31,00	46	77
5	27,03	09	97	6	08	53	81
4	12	17	10,01	5	16	60	85
3	20	23	05	4	24	67	88
2	29	31	09	3	32	73	92
1	38	38	13	2	40	80	96
0	46	45	16	1	47	86	99
0,9669	54	52	19	0	55	93	12,03
8	63	60	24	0,9619	63	99	07

d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині			d ₂₀ ²⁰	Вміст спирту у розчині		
	об. %	мас. %	мол. %		об. %	мас. %	мол. %
0,9618	31,71	26,07	12,11	0,9570	35,23	29,11	13,82
7	78	13	14	0,9569	30	17	86
6	86	20	17	8	37	23	89
5	94	26	21	7	44	29	92
4	32,01	33	25	6	50	34	96
3	09	39	29	5	57	40	99
2	16	45	32	4	64	46	14,03
1	24	52	36	3	71	53	06
0	32	59	40	2	78	59	10
0,9609	39	65	43	1	85	65	13
8	47	72	47	0	92	71	17
7	54	78	50	0,9559	99	77	21
6	62	85	54	8	36,05	82	24
5	70	92	58	7	12	88	27
4	77	98	61	6	19	94	31
3	85	27,05	65	5	26	30,01	34
2	92	11	68	4	33	07	38
1	99	17	72	3	40	13	41
0	33,07	24	76	2	46	18	45
0,9599	14	30	79	1	53	24	48
8	22	37	83	0	60	30	52
7	29	43	86	0,9549	66	35	55
6	36	49	90	8	73	42	59
5	44	56	94	7	80	48	62
4	51	62	97	6	86	53	65
3	58	68	13,01	5	93	59	69
2	66	75	04	4	37,00	65	72
1	73	81	08	3	07	71	76
0	81	88	12	2	13	77	79
0,9589	88	94	15	1	20	83	83
8	95	99	19	0	27	89	86
7	34,02	28,06	22	0,9539	34	95	90
6	10	13	26	8	40	31,00	93
5	17	19	29	7	47	06	97
4	24	25	33	6	53	12	15,00
3	31	31	36	5	60	19	04
2	38	37	40	4	66	23	07
1	45	43	43	3	73	29	10
0	52	49	46	2	79	35	14
0,9579	59	55	50	1	86	41	17
8	66	61	54	0	92	46	20
7	74	68	58	0,9529	99	52	24
6	81	74	61	8	38,06	58	28
5	88	80	65	7	12	64	31
4	95	86	68	6	19	70	35
3	35,20	92	72	5	25	75	38
2	09	99	75	4	32	81	42
1	16	29,05	79	3	38	87	45

Рецептура барвників та реактивів.

Метиленова синь за Леффлером: 30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього; 1 мл 1%-вого водяного розчину їдкого калію і 100 мл дистильованої води.

Карболовий фуксин Циля (карболовий фуксин): 100 мл 5%-вого водного розчину свіжоперегнаного фенолу і 10 мл насиченого спиртового розчину фуксину основного; приготовану суміш через 48 годин відфільтровують; барвник стійкий.

Судан III: 0,1 г судану розчиняють у 20 мл 96%-вого етанолу.

Розчином йоду в йодистому калії: 7 г йоду + 20 г KI на 106 мл води.

Кислий спирт: спирт + 3% соляної кислоти.

Кислий розчин сульфату заліза (III): 50 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ розчиняють у воді, додають 200 мл сірчаної кислоти, об'єм доводять до 1 л.

Реактив Фелінга I: 40 г кристалічного мідного купоросу ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у мірній колбі на 1 л у H_2O дист.

Реактив Фелінга II: 200 г сегнетової солі (подвійної виннокислої солі калію-натрію) та 150 г КОН розчиняють у мірній колбі на 1 л у H_2O дист.

Титрувальний розчин перманганату калію: 5 г KMnO_4 на 1 л H_2O дист., титр за мідю буде 10 мг.

Приготування аміачного розчину AgNO_3 . Приготування здійснюють наступним чином: у пробірку вносять 1-2 мл 10%-вого розчину азотнокислого срібла і додають у нього по краплях аміак. Спочатку з'являється бура каламуть (Ag_2O), що потім розчиняється в NH_3 . Цим розчином і змочують папірець.